(4)

Zur

Chemie der Netzhautstäbchen.

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der medicinischen Doctorwürde der hohen medicinischen Fakultät zu Heidelberg

vorgelegt von

H. Dreser aus Darmstadt

im März 1884.

Referent und Decan: **Geh. Rath Prof. W. Kühne.**

München 1885.
Druck von R. Oldenbourg.

OPHTHALMOLOG LIBR

4

Zur Chemie der Netzhautstäbchen.

Von

Heinrich Dreser.

Als durch Boll die rasche Veränderung der rothen Farbe der frisch herausgenommenen Netzhaut von Fröschen und das allmähliche Vergehen dieser Farbe im lebenden Auge durch das Licht bekannt geworden war, gelang es Kühne den Beweis zu liefern, dass die Färbung der Stäbchenaussenglieder nicht dureh physikalische Phänomene, wie z. B. durch Interferenz, sondern durch einen chemischen Körper, durch einen Farbstoff bedingt sei. Kühne extrahirte den Farbstoff unter Abschluss der denselben zerstörenden Strahlen des Spectrums durch wässerige Lösungen gallensaurer Salze und stellte klar filtrirende Lösungen davon her, welche ebenso durch Licht gebleicht wurden, wie die rothen Netzhäute selbst; er nannte den extrahirbaren, photochemisch zersetzbaren Körper „Sehpurpur". Nach diesen Erfahrungen lag es nahe, die Netzhaut mit der lichtempfindlichen Platte des photographischen Apparats zu vergleichen, indem nunmehr in den Sehelementen ein durch Lichtwirkung zersetzlicher Körper gefunden war, dessen physiologische Bedeutung dem in der Photographie benützten Haloidsilbersalz entsprach. Der nächstliegende Gedanke war der, dass durch die photochemische Zersetzung dieses Körpers ein Reiz im nervösen Endapparat ausgelöst wurde, der von der zugehörigen Opticusfaser zum psychooptischen Centrum der Grosshirnrinde geleitet, dort als Lichteindruck empfunden würde. Kühne hat jedoch gezeigt, dass der Sehpurpur für das Zustandekommen der Lichtempfindung nicht unumgänglich ist; er hat nämlich erwiesen, dass die Zapfen gar keinen Sehpurpur enthalten, und dass an der Macula lutea, der Stelle des deutlichsten Sehens, wo nur Zapfen

1841164

sind, gar kein Sehpurpur vorhanden ist. Ferner vermisste Kühne den Purpur in den Netzhautstäbchen mehrerer Vögel. Er hat deshalb die Vermuthung ausgesprochen, dass mehrere Sehstoffe existirten; einer von diesen sei auch der Sehpurpur; weil nun dieser Körper farbig, sein letztes Zersetzungsproduct aber farblos ist, so können wir an ihm den photochemischen Vorgang wahrnehmen. Auf die chemische Reaction der Froschnetzhaut ist die Belichtung, wie Kühne nachwies, ganz ohne Einfluss; sie reagirt, einerlei, ob belichtet, oder im Dunkeln gehalten, in beiden Fällen alkalisch.

Von Sehpurpurreactionen, die von Kühne für eine grosse Reihe chemisch einwirkender Substanzen ermittelt wurden, will ich speciell Folgendes hervorheben, weil es für die Versuche, die ich zu beschreiben habe, vorausgeschickt werden muss. Der Sehpurpur wird zerstört durch Alkohol, freie Säuren und freie fixe Alkalien; er wird aber nicht angegriffen durch freies Ammoniak, Alkalicarbonate, saure Salze, ferner auch nicht durch Reductionsmittel wie Zinnchlorür in ammoniakalischer Lösung. Gegen Oxydationsmittel zeigt der Sehpurpur gleichfalls eine auffallende Widerstandsfähigkeit. Selbst ein mehrstündiger Ozonstrom durch die mit Galle bereitete Lösung von Sehpurpur geleitet wirkte nicht auf ihn, wie Kühne constatirte; ebensowenig neutralisirtes Wasserstoffhyperoxyd. Unter anderen Oxydationsmitteln hatte Kühne auch die (Ueber)-Osmiumsäure (OsO_4) versucht, weil aber in den Stäbchenaussengliedern der Froschnetzhaut ein Körper enthalten ist, der sich mit Osmiumsäure sehr rasch zunächst olivenbraun und dann schwarz färbt, so war durch diese störende Färbung eine ganz sichere Beobachtung über das Verhalten des Sehpurpurs nicht gut möglich. Inzwischen fand Unna, dass man jede Osmiumschwärzung in mikroskopischen Präparaten durch die nachträgliche Behandlung mit Wasserstoffhyperoxyd sehr rasch beseitigen könne. Herr Geh. Rath Kühne forderte mich nun auf, mit diesem neuen Hilfsmittel die Einwirkung der Osmiumsäure auf den Sehpurpur zu studiren. Diese Frage war der Ausgangspunkt für die nachfolgenden Versuche.

Auf die von Kühne[1]) angegebene Weise entnahm ich im Dunkelzimmer bei Natriumlicht eine purpurne Netzhaut von einem 3 bis

1) Vgl. Kühne, Untersuchungen des physiol. Instituts zu Heidelberg Bd. 1 S. 48.

4 Stunden dunkel gehaltenen Frosch, legte sie ungefähr 2 bis 3 Minuten in Osmiumsäure und entfärbte sie darauf mit neutralisirtem Wasserstoffhyperoxyd. Die Betrachtung am Tageslicht zeigte, dass die Aufhebung der Osmiumschwärzung ausgezeichnet gelungen war, dass aber vom Sehpurpur nicht mehr das Geringste zu sehen war. Die vorher purpurne Netzhaut war gerade so blass und farblos, wie die Retina, welche nach der Bleichung durch Licht derselben Procedur unterworfen worden war. Es war nun die Frage zu entscheiden: Ist diese Vernichtung des Sehpurpurs die Wirkung der Combination beider Oxydationsmittel oder der Osmiumsäure allein? Zu diesem Zweck musste man die Retina zunächst einem Verfahren unterwerfen, welches die Einwirkung des Myeloids auf die Osmiumsäure, wodurch ja die Schwärzung der Netzhaut bedingt wird, paralysirt, zugleich aber auch den Sehpurpur nicht angreifen darf. Solcher Mittel gelang es mir zwei zu finden. Erstens braucht man nur die frisch herausgenommene Netzhaut mit neutralisirtem Wasserstoffhyperoxyd gründlich zu behandeln. Durch dieses Oxydationsmittel wird das Reductionsvermögen des Myeloids gegen Osmiumsäure aufgehoben und die Schwärzung durch die nachfolgende Osmiumsäure umgangen. Man muss das Wasserstoffhyperoxyd aus der Retina entfernen durch Auswaschen in mit Soda schwach alkalisch gemachten Wasser, weil sich Wasserstoffhyperoxyd in alkalischer Lösung sehr leicht und rasch zersetzt. Man begegnet so dem Einwand, es könne vielleicht das noch im Präparate steckende Wasserstoffhyperoxyd mit der hinzukommenden Osmiumsäure die Vernichtung des Sehpurpurs bewirken. Die nach diesen Vorsichtsmaassregeln behandelten Netzhäute zeigen die innerhalb 2 Minuten erfolgende Zerstörung des Sehpurpurs durch einprocentige Osmiumsäure allein. Die zweite Behandlungsweise der Netzhaut besteht in mehrstündigem (meist über Nacht) Stehenlassen in fast concentrirten Salzlösungen, wozu ich in der Regel Chlorammonium anwandte. Auch hierdurch bleibt der Sehpurpur intact und nach dem Auswaschen mit Wasser und Einlegen in Osmiumsäure von 1% wird der Sehpurpur ebenfalls in ca. 2 Minuten zerstört, ohne anderweitige störende Färbung. Hierdurch ist bewiesen, dass die Osmiumsäure den Sehpurpur allein zu zerstören vermag.

Da die Stäbchenaussenglieder bei den Säugethieren viel weniger

durch OsO_4 zu schwärzendes Myeloid enthalten als beim Frosch, so wurde eine Kaninchennetzhaut ohne solche Vorbereitungen direct in Osmiumsäure eingelegt; sie färbte sich darin hellbräunlich. Mit Wasser ausgewaschen und an das Tageslicht gebracht, konnte ich vom Sehpurpur nichts mehr wahrnehmen; dass er etwa von der schwachbraunen Osmiumfärbung überdeckt gewesen sei, war mir nicht wahrscheinlich, denn sonst hätte die Retina durch das Verweilen im Tageslicht wegen des Ausfalls der zugemischten Purpurfarbe einen anderen Farbenton annehmen müssen, was ich nicht constatiren konnte.

Der Osmiumsäure ganz analog verhält sich das übermangansaure Kalium. Aber es hat rücksichtlich seiner histologischen Verwendbarkeit gegenüber der Osmiumsäure manche Nachtheile. Es bildet nämlich das durch Reduction ausgeschiedene Manganoxydul, dadurch, dass es sich auf der von der Permanganatlösung berührten Oberfläche direct niederschlägt, eine schützende Decke, so dass die Lösung nur sehr schwer das ganze Präparat durchdringen kann. Während der Sehpurpur gegen andere Oxydationsmittel eine auffallende Widerstandsfähigkeit besitzt, ist die Wirkung der Osmiumsäure und des Kaliumpermanganates eine ganz einzig dastehende. Eisenchloridlösungen, deren freie Säure durch Ammoniak abgestumpft war, lassen den Sehpurpur intact, was man trotz der hellbraunen Färbung des Netzhautgewebes doch noch ganz gut wahrnehmen kann. In concentrirten Lösungen von chlorsaurem, überchlorsaurem und überjodsaurem Kalium conservirt sich der Sehpurpur ausgezeichnet. Da die einfachen Lösungen dieser oxydirenden Salze nicht auf ihn einwirkten, versuchte ich ein Mittel, welches nach dem Vorgang von Guyard[1]) in der Anilinfarbentechnik zur Bildung von Anilinschwarz angewandt wird. Die oxydirende Flüssigkeit, welche zugesetzt wird, ist nämlich eine Lösung von chlorsaurem Kalium, welche 0,2% metavanadinsaures Ammonium enthält. Die Oxydation vermittelst des Vanadiums wird gerade so, wie dies bezüglich des Arsens Binz und Schultz in ihrer Theorie über die Giftwirkung des Arsens behaupten, durch das „intramolecularschwingende Sauerstoffatom“ ausgeführt. Das Vanadium, welches

1) Vgl. G. Schultz, Chemie des Steinkohlentheers 1882 S. 416.

sowohl sehr leicht oxydirbar, als auch wieder reducirbar ist, wirkt dadurch, dass seine verschiedenen Oxydationsstufen sehr leicht in einander übergehen, gewissermaassen als Sauerstoff übertragendes anorganisches Ferment, oder richtiger Enzym, ohne selbst mit dem zu oxydirenden Körper eine chemische Verbindung einzugehen. Eine solche Lösung, von deren energischer Wirkung auf die Leukoverbindung des Dahliafarbstoffes ich mich überzeugt hatte, vermochte selbst nach tagelanger Einwirkung auf purpurne Netzhäute nicht den Sehpurpur zu verändern, sowohl wenn die Reaction dieser Lösung durch Ammoniak alkalisch, als auch wenn sie neutral, oder sauer war. Die saure Reaction darf nur durch saure Salze wie H_2NaPO_4 bedingt sein, denn freie Säuren vernichten den Sehpurpur. Ebenso erfolglos war eine Lösung, welche statt chlorsauren Kaliums überjodsaures Kalium enthielt. Der Sehpurpur erwies sich für das „intramolecular-schwingende Sauerstoffatom“ ebenso unzugänglich, wie Kühne's Purpurcholatlösung für den activen Sauerstoff in der Form eines Ozonstromes. Die Erfolglosigkeit solcher Oxydationsversuche rechtfertigt die Ansicht, dass der Sehpurpur ein schon so hoch oxydirter Körper sei, dass er keinen weiteren Sauerstoff mehr aufzunehmen vermöge.

Mit der Lösung des überjodsauren Kaliums konnte ich die Thatsache bestätigen, dass das freie Jod den Sehpurpur zerstört. Bringt man nämlich Lösungen von überjodsaurem Kalium und Jodkalium zusammen, so wird die Flüssigkeit sogleich braun durch die Ausscheidung von Jod. Um die Entwicklung des Jods im Netzhautgewebe selbst vor sich gehen zu lassen, legte ich eine bei Natriumlicht präparirte purpurne Netzhaut in Jodkaliumlösung. Nachdem sie sich damit hinreichend imprägnirt und nicht entfärbt hatte, kam sie in die Kaliumhyperjodatlösung, wo sie sofort eine hell jodbraune Farbe annahm unter rascher Zerstörung des Sehpurpurs. Auch die dunkel violette Lösung von Jod in Schwefelkohlenstoff bleicht purpurne Netzhäute in sehr kurzer Frist. Nach dem Auswaschen in reinem Schwefelkohlenstoff, welcher den Sehpurpur nicht angreift, zeigten sich die Netzhäute bei der Betrachtung am Tageslicht vollkommen entfärbt und purpurfrei.

Bekanntlich ist eine zwei- bis fünfprocentige wässerige Lösung gallensaurer Salze bis jetzt das einzige Mittel, welches den Seh-

purpur aus den Stäbchen ohne Veränderung zu lösen vermag. Alle anderen Versuche, welche Kühne nach Analogie der Aufschliessung der rothen Blutkörperchen und Darstellung des Hämoglobin auf die Retina übertrug, hatten nicht den gewünschten Erfolg. Vor kurzem war nun von Afanassiew[1]) entgegen der früheren Angabe von Stadelmann[2]) behauptet worden, dass eine wässerige Lösung von Toluylendiamin die rothen Blutkörperchen aufzuschliessen vermöge. Als ich purpurne Netzhäute in Toluylendiamin einlegte, schien die Flüssigkeit nach mehreren Stunden sehpurpurhaltig, aber etwas trübe. Das Filtrat davon war jedoch purpurfrei. Die Beobachtung unter dem Mikroskope zeigt, dass durch das Zufliessenlassen sowohl von freiem Toluylendiamin, als auch seines neutralen essigsauren Salzes ein rapider Zerfall der Stäbchenaussenglieder in einzelne Querscheibchen erfolgt. Auf diese Weise kann sehr leicht eine Suspensionsflüssigkeit sich bilden, die scheinbar Sehpurpur enthält, während derselbe doch ungelöst an die Fragmente der Stäbchen gebunden bleibt.

Sogar die Lösung des Sehpurpurs durch Galle ist wahrscheinlich ein etwas complicirterer Vorgang. Offenbar muss die Galle zuerst ein Vehikel lösen, welches den Purpur mit in seine Lösung herüberzieht. Dieses Vehikel ist nämlich nach Eintritt der Todtenstarre für Galle unlöslich, weshalb zu dieser Zeit der Sehpurpur auch nicht mehr darin löslich ist. Ferner konnte ich dieses Vehikel coaguliren durch Einwirkung von schweren Metallsalzlösungen, wozu sich essigsaures Blei am geeignetsten erwies, weil es den Netzhäuten keine störende Färbung verleiht, wie etwa Kupfer oder Eisensalze und auch nach beliebig langer Einwirkung den Sehpurpur ausgezeichnet conservirt, während ihn Quecksilber- oder Zinkchlorid bald verändern. Aus den auf diese Weise gehärteten Netzhäuten musste das überschüssige Bleisalz durch mehrstündiges Betropfen mit Wasser ausgewaschen werden, damit die zum Lösen des Sehpurpurs zuzusetzenden gallensauren Salze keinen Niederschlag von gallensaurem Blei bilden können, wodurch der Sehpurpur gänzlich verdeckt worden wäre. So behandelte Retinae konnten über Nacht in

1) Pflüger's Archiv Bd. 30 S. 424.

2) Archiv für exper. Pathol. und Pharmakologie 1882 Bd. 15.

fünfprocentiger Galle liegen, ohne dass der Sehpurpur ausgezogen wurde, während eine frische Retina darin in anderthalb bis zwei Stunden bis auf einige kleine Gewebsreste aufgelöst war. Diese Fällbarkeit des Vehikels durch Blei legt die Vermuthung nahe, es sei vielleicht ein Eiweisskörper. Unterstützt wird diese Vermuthung durch die Beobachtung von Ayres[1]), dass man die Wirkung der Todtenstarre paralysiren kann, wenn man die Netzhäute in zehnprocentige Kochsalzlösung einlegt, wodurch der Sehpurpur für längere Zeit extrahirbar bleibt. Diese Eigenschaft weist darauf hin, dass das Vehikel ein myosinartiger Eiweisskörper ist. Dass fünfprocentige Galle selbst von trocknen Eiweisskörpern, wenn sie nur fein zerrieben sind, etwas zu lösen vermöge, zeigte sich an einer Vitellinprobe, die Herr Dr. Mays so freundlich war, mir zu überlassen. Alkohol bewirkte nämlich in der Gallelösung, welche mit dem fein gepulverten Vitellin gestanden hatte, eine Trübung, die sich im Spitzglas als weisser flockiger Niederschlag absetzte. Nach mehrmaligem Waschen mit Alkohol und Abpipettiren behufs Entfernung der gallensauren Salze, gab dieser Niederschlag eine ganz deutliche Xanthoproteïnsäurereaction.

Zum Schluss meiner Versuche über den Sehpurpur will ich noch den Einfluss des Pilokarpins auf dessen Regeneration beschreiben. Der eine von drei in der Sonne belichteten Fröschen hatte purpurfreie Netzhäute, vollkommen farblos, ohne Sehgelb. Da die beiden anderen sich unter den gleichen Bedingungen befanden, war anzunehmen, dass ihre Netzhäute ebenso beschaffen waren. Der zweite Frosch bekam nun etwa zwei Tropfen einer zehnprocentigen Pilokarpinlösung in den Lymphsack injicirt. Der dritte diente zur Controle und bekam nichts injicirt. Nach einem halbstündigen Dunkelaufenthalt beider waren die Netzhäute des mit Pilokarpin vergifteten Frosches stark roth, während diejenigen des Controlefrosches in ihrer Röthung lange nicht soweit vorgeschritten waren. Der Umstand, dass die Netzhäute roth waren, beweist, dass die Regeneration des Sehpurpurs auf „anagenetischem“ Wege erfolgt war; d. h. noch vorhandenes Sehweiss

1) Untersuchungen des physiol. Instituts zu Heidelberg, herausgegeben von Kühne Bd. 2 S. 445.

(Leukopsin), welches aus den Stäbchen noch nicht abgeführt war, ist durch die Thätigkeit des Pigmentepithels durch die Stufenreihe, welche mit Sehgelb (Xanthopsin) beginnt, dann Chamois-Orange-Roth in Purpur zurückverwandelt worden. Diese Differenz zu Gunsten des Pilokarpinfrosches zeigt, dass diejenige Function des Pigmentepithels, die als Rhodophylaxe bezeichnet worden ist, durch das Pilokarpin nicht bloss beim Kaninchen, wie Ayres und Kühne[1]) fanden, sondern auch beim Frosch erheblich angeregt wird. Bei Neogenese des Purpurs hätte man erstens nach einer halben Stunde eine so starke Färbung noch gar nicht beobachten können, und zweitens hätte die Farbe nicht roth, sondern nur blass lila sein dürfen. Wiederholungen dieses Versuchs mit Abkürzung der Dunkelfrist und also auch der Pilokarpinwirkung ergab, wie zu erwarten, geringere Grade der Regeneration und geringere Differenzen. Gleich sichere Beobachtungen über Neogenese des Purpurs konnte ich nicht bekommen, weil der Himmel nicht andauernd lange wolkenfrei war, so dass ich hätte sicher sein können, dass überhaupt kein Sehweiss mehr vorhanden gewesen wäre. Versuche mit Atropin, welches man nach der Wirkung auf andere Drüsen gewissermaassen das Curare der Drüse nennen könnte, zeigten selbst bei Injection von 0,02^{g} in den Lymphsack gar keine Verzögerung in der Regeneration des Sehpurpurs mit normalen Fröschen verglichen. Da bekanntlich Muskarin auf die Schweissdrüsen einen sekretorischen Reiz ausübt, wurden auch hiermit Versuche gemacht. Erst bei sehr starken Dosen unter gleichzeitiger Anwendung von Atropin, um die Circulation im Gang zu erhalten, kam bei Neogenese eine so schwache Verstärkung in der Regeneration zum Vorschein zu Gunsten des Muscarins, dass man nicht berechtigt ist, demselben einen irgend erheblichen Einfluss auf die Regeneration zuzuschreiben. Die Körperwärme der Frösche hat bei solchen Versuchen einen viel grösseren Einfluss als irgend ein Gift, so dass man durch diesen Factor den grössten Täuschungen unterliegen kann, wenn man es unterlässt, unter denselben Bedingungen gehaltene Controlfrösche mit zu untersuchen.

1) Untersuchungen des physiol Instituts zu Heidelberg Bd 2 („Ueber Regeneration des Sehpurpurs beim Säugethiere").

Der Sehpurpur ist in den einzelnen Stäbchenaussengliedern in so geringer Menge enthalten, dass er erst wahrgenommen werden kann, wenn das Licht die Stäbchen in der Richtung der Längsachse passirt hat. Könnte man vielleicht einen Farbstoff finden, welcher mit dem Sehpurpur oder beliebigen anderen Sehstoffen einen ähnlichen Farbenumschlag gäbe und an Ort und Stelle fixirt würde, wie dies Wissozky[1]) bezüglich des Hämoglobin fand, welches mit Eosin hell chamoisfarben wird, so könnte man über die histologischen Details bei den verschiedenen Regenerationsprocessen, der Anagenese und Neogenese, werthvolle Aufschlüsse bekommen. Leider gelang es mir nicht, einen solchen Farbstoff zu finden. Eosin concentrirt in Glycerin gelöst, verhielt sich indifferent gegen den Sehpurpur, während das Hämoglobin der rothen Blutkörperchen, welche vereinzelt im Präparate vorkommen, sich sehr charakteristisch in der von Wissozki beschriebenen Weise gefärbt hatte. Ebenso erfolglos war ein Färbeversuch der frischen purpurnen Retina mit Dahlia. Die Aussenglieder der Stäbchen und Zapfen vermochten keinen von allen von mir versuchten Farbstoffen zu fixiren, während sich die Innenglieder mit manchen, z. B. mit Dahlia, recht gut färbten.

Die Histologie der Stäbchen betreffend hat Kuhnt nachgewiesen, dass jedes Stäbchenaussenglied eine Neurokeratinscheide besitzt, die am Innenglied dünner werdend auch dieses umkleidet und weiterhin wahrscheinlich mit der Membrana limitans externa im Zusammenhange steht. An dieser Hülle des Stäbchenaussengliedes kann man oft bei günstigen Objecten eine zarte längslaufende Cannelirung sehen. Ausserdem enthalten die Stäbchenaussenglieder auch Cerebrin, wie Kühne fand. Es hinterblieb nach der Pepsin- und Trypsinverdauung als ein in siedendem Alkohol und Benzol sich lösender Rückstand.

Die Hauptmasse der Stäbchenaussenglieder bildet nach M. Schultze eine sehr leicht in Querplättchen oder Ringe zerfallende Substanz, welche sich besonders beim Frosch mit Osmiumsäure intensiv färbt, indem die Farbe von gelbbraun oder olivengrün sehr

1) M. Schultze's Archiv Bd. 13 S. 479.

rasch in schwarz übergeht, im Gegensatz zum Nervenmark, welches sich mehr blauschwarz oder mindestens doch neutral schwarz färbt. Wegen dieser dem Nervenmark analogen Reaction gegen Osmiumsäure gab Kühne dieser Substanz den Namen „Myeloid", womit durchaus keine bestimmte chemisch reine Substanz, sondern ein Gemenge reducirender Körper, wie sie im Nervenmark neben einander vorkämen, bezeichnet werden sollte. Diese in Querscheiben zerfallende Grundsubstanz der Stäbchenaussenglieder ist offenbar nicht homogen, sondern die centrale Partie ist heller und durchsichtiger als die Randpartie. Ich konnte dies ganz gut beobachten, als ich zu einem frischen Netzhautpräparat eine Lösung von essigsaurem Tolnylendiamin fliessen liess. Sofort krümmten sich die eben noch normalen Stäbchen und zeigten fast augenblicklich die durch die Spaltung im Querplättchen bedingte Querstreifung, so dass ein solches Stäbchen aussah, als wäre es, wie eine Geldrolle aus auf einander geschichteten Querscheibchen zusammengesetzt. An den Enden dieser Rolle waren einzelne Scheibchen umgefallen, so dass man, wie bei der Münze die Prägung, so hier im Centrum eine sehr lichte Stelle, vielleicht einen Kanal erkennen konnte. Hensen hat einen Achsenkanal beschrieben, was derselbe enthält, ist nicht zu bestimmen, da an frischen Netzhautpräparaten der Kanal nicht sichtbar ist. Es lag nahe, in dem Inhalt dieses Kanals eine Fortsetzung der Substanz des Stäbcheninnengliedes zu vermuthen. Meine Färbeversuche der frischen Netzhaut mit Dahlia ergaben, dass sich bei den Innengliedern, d. h. den „Sinnesepithelzellen" sowohl Protoplasimaleib als auch Kern recht gut gefärbt hatten; aber eine, wenn auch noch so geringfügige Fortsetzung gefärbter Substanz vom Innenglied in das Aussenglied, worauf ich besonders achtete, war durchaus nicht zu beobachten. Es scheint demnach wohl der Inhalt der „Hensen'schen Kanäle" oder der „Ritter'schen Faden" etwas in seiner histochemischen Beschaffenheit vom Stäbcheninnenglied Differentes zu sein. Färbungsversuche mit Nigrosin an in Chromsäure und Alkohol gehärteten Netzhäuten zeigten ebenfalls nichts von einer axialen Substanz.

Nichtsdestoweniger konnte ich aber das Vorhandensein einer axialen Substanz in den Stäbchenaussengliedern sehr gut nachweisen. Legt man nämlich eine frische Retina 4 Stunden in halb-

procentige Kochsalzlösung, so erleiden die Stäbchen eine eigenartige Quellung. Nach der Härtung und Schwärzung in Osmiumsäure von 1% zeigte ein Zupfpräparat die freien Stäbchenaussenglieder durch die Quellung um das Dreifache bis Vierfache verbreitert. Der merkwürdigste Befund war aber, dass die sich schwärzende Substanz keine Querscheiben mehr bildete, sondern ziemlich breite Ringe; der Kanal, den die Lumina der einzelnen Ringe bildeten, wurde von einer schwach gelblich gefärbten Substanz ausgefüllt, welche eine deutliche netzförmige Zeichnung bot. Oft war die nach dem Pigmentepithel zu gelegene Kuppe der Stäbchen zur Vacuole ausgeweitet. Einmal hatte der netzförmige Vacuoleninhalt den Ringmantel durchbrochen, und bei besonderer Einstellung konnte man sehr gut die Bruchpforte und den Zusammenhang des Inhalts mit dem aussen liegenden Theil sehen. Oefters war an dem durch die gequollene Axensubstanz ad maximum gedehnten Ringmantel nach der Seite des Innengliedes ein Stück weggebrochen. Gerade solche Stäbchenfragmente zeigten sehr deutlich, wie die hellgelbliche Axensubstanz von dem durch Osmium geschwärzten Hohlcylinder umschlossen war. Diese Quellbarkeit in einer indifferenten Flüssigkeit, wofür die halbprocentige Kochsalzlösung in der Physiologie gilt, theilt die Axensubstanz der Stäbchen mit dem Axencylinder der Nervenfasern, welcher ebenso durch Lymphe und 0,5% Cl Na-Lösung verändert wird[1]). Coagulationsversuche, auch die Methode von Pflüger, die an den frischen Nervenfasern so deutlich den Axencylinder sichtbar macht, nämlich das Einbetten in Collodium, deckte an den Stäbchen ebensowenig eine besondere Structur auf, wie Färbung mit Dahlia, Eosin, Methylgrün, Methylenblau, Pikrocarmin, Pikrinsäure und Säurefuchsin. Indessen hatte ich öfters bei der Behandlung mit Wasserstoffhyperoxyd an der nach dem Pigmentepithel zu gelegenen Seite des Stäbchens eine Vacuolenbildung gesehen. Bei Netzhäuten, die in H_2NaPO_4 gelegen hatten, sah ich manchmal in der Axe des Stäbchens angeordnete Körnchen. Bei der Behandlung mit Aether waren die Stäbchen sehr stark verlängert und ich konnte einige Male nicht bloss eine Vacuole, sondern bis zu drei sehen, welche eigentlich aufeinanderfolgende Aus-

1) Rumpf in den Untersuchungen des physiol. Instituts zu Heidelberg Bd. 2 („Zur Histologie der Nervenfaser und des Axencylinders").

buchtungen eines sehr schmalen Axenkanals darstellten, der offenbar keinen festen Inhalt besass. Die von Schultze und Rudnew beschriebene Osmiumreaction beruht also nicht auf einer in dem ganzen Stäbchen homogen vertheilten reducirenden Substanz, sondern die axiale Partie ist frei davon. Ich konnte aber nachweisen, dass das Reductionsvermögen nicht der Grundsubstanz, welche die Querscheibchen oder Ringe bildet, eigenthümlich ist, sondern dem Myeloid zukommt, womit dieselbe imprägnirt ist. Denn an einer Netzhaut, die in fünfprocentiger Lösung von chlorsaurem Kalium gelegen hatte, vermochte die Osmiumsäure nur eine hellbraune Farbe zu erzeugen, d. h. das Myeloid war durch die beinahe concentrirte Salzlösung ausgezogen worden, während die Sonderung in Axensubstanz und Ringmantel sich so deutlich vollzogen hatte, wie an dem mit 0,5 procentige Cl Na-Lösung behandelten Präparate. Ferner findet man auch bei dem Frosch gelegentlich vereinzelte Stäbchen, die sich mit Osmiumsäure nur lichtbraun färben, etwa wie beim Kaninchen, was darauf hinweist, dass die Intensität der Osmiumfärbung nicht von der Grundsubstanz, sondern von deren Gehalt an Myeloid abhängig ist. Ich stelle mir deshalb das Verhalten zwischen Myeloid und Ringsubstanz derart vor, wie es vom Hämoglobin und dem Stroma der Blutkörperchen beschrieben wird. Dem Stroma der rothen Blutkörperchen entspricht die Grundsubstanz der Stäbchen, welche vom Myeloid innig durchdrungen ist.

Was ist aber dieses Myeloid? Es scheint, als ob es Manche mit dem Lecithin indentificiren möchten. Ich kann dem nicht beipflichten, denn erstens gibt gut gereinigtes Lecithin erst nach langem Stehen mit 1% Osmiumsäure im Uhrglase eine Schwärzung der Flüssigkeit; und in den ersten 3 bis 4 Stunden erscheint das Lecithin selbst makroskopisch nur schwach olivenfarben, und mikroskopisch ist an Partikelchen von der Dicke eines Stäbchens eine Färbung kaum wahrzunehmen. Ich habe dieses Resultat mit Lecithin bekommen, sowohl vor als nachdem ich es aus Eisessig umkrystallisirt hatte. Daraus erhellt schon, dass das Reductionsvermögen des wirklich reinen Lecithins viel zu schwach ist, um die Stäbchenschwärzung zu erklären. Es kann daher gar nicht die Rede davon sein, die starke Mikroreaction der Stäbchen gegen Osmiumsäure mit der mikroskopisch nichtssagenden des Lecithins

zu vergleichen. Man darf solche Vergleiche überhaupt nur jeweils mikro- oder makroskopisch anstellen, d. h. nicht verschieden dicke Schichten gefärbter Substanzen mit einander auf Färbung vergleichen wollen. Wenn man aber ein einfaches Extract der Retina mit kaltem Alkohol, welches sich nach Verjagen des Alkohols allerdings mit Osmiumsäure bald und auch stark färbt, für auch nur einigermaassen reines Lecithin ausgeben will, so ist dies nach Hoppe-Seyler durchaus nicht gerechtfertigt, da dieser Autor ausdrücklich angibt, dass z. B. Inosit und andere Körper vom Lecithin mit in alkoholische Lösung herübergezogen werden. Ein weiteres Argument gegen die Identität des Lecithins mit dem Myeloid ist in folgendem Parallelversuche gegeben. Eine Retina, mit neutralisirtem Wasserstoffhyperoxyd behandelt, wird durch Osmiumsäure nach dem Auswaschen mit Wasser nicht mehr gefärbt; Lecithin derselben Procedur unterworfen färbt sich ebenso schwach vor wie nachher. Als dritten und wichtigsten Grund, der gegen diese Identität spricht, führe ich an, dass es durch Einlegen in fast concentrirte Salzlösungen (Salmiak) den sich schwärzenden Bestandtheil auszuziehen gelingt, während im Gegensatz Lecithin durch Salzlösungen bekanntlich gefällt wird. Gerade diese letzte Beobachtung gibt uns auch über die wahre Natur des Myeloids Aufschluss. Denn welchen Körper kennt man in der physiologischen Chemie, der diese Löslichkeit und Nichtfällbarkeit durch concentrirte Salzlösung besitzt? Diese Eigenschaft kommt einzig und allein dem Vitellin zu, welches von Hoppe-Seyler [1]) genauer charakterisirt worden ist. Nach diesem Autor gehört das Vitellin zur Klasse der Globuline und ist entweder eine Doppelverbindung von Lecithin mit einem Eiweisskörper, welche man Lecithoalbumin nennen kann, oder aber es ist ein sehr inniges Gemenge dieser beiden Körper, die man aber nicht von einander zu trennen vermag, ohne den Eiweissantheil zu coaguliren oder sonstwie zu verändern. Vitellin ist, nachdem man durch Erschöpfen der Eidotter mit Aether kein freies Lecithin mehr aus denselben extrahiren konnte, schon durch kalten Alkohol spaltbar in Lecithin und coagulirtes Albumin, ferner wird es ebenso zerlegt durch Salzsäure von 1 pr. m. An einer Vitellinprobe, die

1) Medicin. chem. Untersuchungen Bd. 2 S. 215.

Herr Dr. Mays so freundlich war mir zu überlassen, und welche dargestellt war durch Erschöpfen der Eidotter mit Aether und Abtrennen einer röthlichen, wässerigen Flüssigkeitsschicht mittelst Scheidetrichter, wodurch die im Eidotter enthaltenen Salze mit entfernt wurden; — an diesem getrockneten Producte konnte ich auch nach nochmaligem Auskochen mit Aether die rasch eintretende dunkelbraune Färbung mit Osmiumsäure von 1% constatiren, welche durch neutralisirtes Wasserstoffhyperoxyd wieder beseitigt werden konnte. Aber wie an den Stäbchenaussengliedern konnte ich auch beim Vitellin eine irgend erheblichere Färbung verhindern, wenn ich es vor der Osmiumeinwirkung in fein zerriebenem Zustande mit neutralem Wasserstoffhyperoxyd behandelt hatte. Eine makroskopische helle Verfärbung musste darum eintreten, weil das abgespaltene Lecithin nicht entfernt wurde, während, wenn man das Vitellin mit Alkohol oder Salzsäure von 2 pr. m. behandelte, auch die makroskopische lichte Färbung ausblieb, weil das abgespaltene Lecithin durch das Wegspülen des Reagens, worin es sich löste, der nachfolgenden Osmiumsäure entzogen war. Hieraus geht hervor, dass das Reductionsvermögen des Vitellins gegen Osmiumsäure viel stärker ist vor der Zerlegung in seine beiden Componenten, als nachdem es in seine Spaltungsproducte getrennt ist. Froschnetzhäute mit Alkohol und Salzsäure von 2 pr. m. behandelt, zeigten, dass das Myeloid der Stäbchen auch darin mit dem Vitellin vollkommen übereinstimmt. Da das Myeloid hiernach zu den Globulinen gehört und nach O. Hammarsten sämmtliche Globuline mit Einschluss des Vitellins durch concentrirtes Magnesiumsulfat ausgefällt werden, so war zu erwarten, dass es durch diese Salzlösung nicht extrahirbar sei. In der That wurde eine Netzhaut, nachdem sie über Nacht darin gelegen, durch Osmiumsäure von ¾ % innerhalb 5 Minuten ganz schwarz. Die nach 2 Minuten vorgenommene mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die Stäbchen schon dunkelbraun waren. Eine weitere Frage ist: wie verhält sich die Netzhaut zum Aether?

Vom Vitellin erklärt Hoppe-Seyler es werde durch Aether nicht gespalten, und ich fand auch nach nochmaligem Auskochen mit Aether sein Reductionsvermögen gegen Osmiumsäure nicht geändert. Das analoge Verhalten sollte man vom Myeloid erwarten.

Es liegen aber Beobachtungen von Chittenden[1]) vor, bestätigt von Cahn[2]), wonach das Myeloid durch Aether extrahirbar sei und sich die Stäbchen nachher mit Osmiumsäure nicht mehr färbten. Ich habe den Versuch wiederholt und könnte ihn bestätigen. Diese scheinbare Störung in dem Parallelismus zwischen Myeloid und Vitellin konnte ich zum Theil aufklären, denn ich konnte ohne viele Mühe an dem von mir benutzten Aether eine saure Reaction nachweisen. Wiederholte ich den Versuch mit Aether, den ich vorher mit Sodalösung ausgeschüttelt hatte, so war nach einstündiger Einwirkung auf die Netzhaut die für Aetherwirkung charakteristische oft kolossale Verlängerung und Streckung der Stäbchenaussenglieder vorhanden, und zugleich war auch die Osmiumreaction dunkler ausgefallen. Ferner darf man wohl Bedenken tragen, ob der in den Laboratorien gebrauchte Aether auch von Spuren von Alkohol frei ist. Auch hat Chittenden die Veränderung der Färbbarkeit mit Osmiumsäure erst ganz allmählich nach tagelanger Einwirkung des Aethers eintreten sehen. Ferner muss an die Möglichkeit gedacht werden, dass der Aether auf das von einer Salzlösung, der Lymphe, umgebene Myeloid anders einwirkt, als auf die von mir benützte Vitellinprobe, deren Salze die im Scheidetrichter abgelassene wässerige röthliche Flüssigkeit gelöst enthielt. So wirkt Aether ja auch verschieden ein auf Eieralbumin, welches in salzhaltiger Lösung durch ihn coagulirt, in salzfreier aber nicht. Vielleicht ist dies die eigentliche Ursache für das abweichende Verhalten des Myeloids gegenüber dem Vitellin. Aus diesen histochemischen Beobachtungen über das Myeloid geht jedenfalls das hervor, dass dessen Identität mit Lecithin mit Sicherheit zu negiren ist. Da die Menge dieses Körpers so klein ist, dass er nicht wohl aus den Netzhäuten in isolirtem Zustande darzustellen ist, so wird man sich nach seinem mikrochemischen Verhalten mit der Vermuthung begnügen müssen, dass er mit dem Vitellin am ehesten zu vergleichen sei.

Es lag nahe, diesen Befund über das Myeloid der Retina auf die markhaltigen Nervenfasern zu übertragen. Es gelang mir aber nicht, die entsprechenden Parallelversuche am Nervenmark mit der Evidenz zu bekommen, wie ich sie an der Retina erhalten hatte.

1) Untersuchungen des physiol. Instituts zu Heidelberg Bd. 2 S. 443.
2) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 5 S. 213.

Die Schwierigkeit, ein bestimmtes Resultat über das Myelin des Nervenmarks zu erhalten, beruht darauf, dass dasselbe allseitig von Neurokeratinscheiden umschlossen ist und ausserdem noch durch quere und schräge Brücken, die Lantermann'schen Einkerbungen, unterbrochen ist. Dieser histologische Bau bietet für die Diffusion z. B. einer albuminhaltigen, concentrirten Salzlösung die ungünstigsten physikalischen Bedingungen dar. Im Gegensatz zum Myeloid der Retina färbt sich das Nervenmark neutral schwarz, selbst bläulich schwarz. Man kann künstlich solche Farbenmischungen bekommen, wenn man Oelsäure mit freiem Neurin mischt und darauf einprocentige Osmiumsäure einwirken lässt. Man hat dann bei der mikroskopischen Betrachtung neben einander oft die braune Oelsäurefarbe, ein neutrales Schwarz und an manchen Stellen sogar einen ganz deutlich stahlblauen Farbenton bei sonst tiefschwarzer Farbe der Umgebung. Vielleicht ist die Differenz zwischen der Stäbchenfarbe und der des Nervenmarks durch solche Beimengungen wie Neurin bedingt.

Zum Schluss erfülle ich eine mir angenehme Pflicht, indem ich Herrn Geh. Rath Kühne für die Anregung zu dieser Arbeit und seinen Rath bei ihrer Ausführung, sowie den Herren Prof. Ewald und Dr. Mays für ihre freundliche Hilfe meinen herzlichen Dank sage.